



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 235 611**

② Número de solicitud: 200301773

⑤ Int. Cl.7: **C12Q 1/44**
G01N 21/64

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **25.07.2003**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2005**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.07.2005

⑦ Solicitante/s:
Universidade de Santiago de Compostela
Edificio Cactus-Citt-Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

⑦ Inventor/es: **Botana López, Luis Miguel;**
Alfonso Rancaño, Amparo;
Pazos Guldrís, María José;
Rodríguez Vieytes, Mercedes;
Loza García, María Isabel y
Vieites Baptista de Sousa, Juan Manuel

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Método cuantitativo para la detección de yessotoxinas en productos pesqueros basado en la activación que producen en las fosfodiesterasas.**

⑤ Resumen:

Método cuantitativo para la detección de yessotoxinas en productos pesqueros basado en la activación que producen en las fosfodiesterasas.

Método cuantitativo para la detección de yessotoxinas en productos pesqueros basado en la activación que la toxina produce en las fosfodiesterasas. La diana celular de la yessotoxina (YTX) y análogos (YTXs) es la activación de las fosfodiesterasas (PDEs). La unión PDEs-YTX da una señal medible. La unión se puede cuantificar mediante un biosensor de afinidad o por fluorescencia. El biosensor detecta interacciones biomoleculares y permite determinar la presencia de YTX por su interacción con las PDEs. Mediante la fluorescencia en placa se determinan las variaciones en la velocidad de degradación del derivado fluorescente antraniloil-AMPc. La velocidad con que las PDEs degradan esta molécula se incrementa en presencia de YTX.

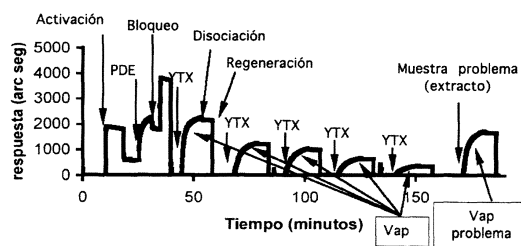


FIGURA 2

ES 2 235 611 A1

DESCRIPCIÓN

Método cuantitativo para la detección de yessotoxinas en productos pesqueros basado en la activación que producen en las fosfodiesterasas.

La presente invención describe la detección y la cuantificación de yessotoxinas *in vitro* en función de su capacidad para activar los enzimas fosfodiesterasas que son una de las dianas celulares de estas toxinas.

Las ficotoxinas marinas son sustancias producidas por algas que representan un grave problema de salud pública. Estas toxinas se acumulan en moluscos y pescados de tal forma que cuando son ingeridos por el hombre dan lugar a intoxicaciones alimentarias. La clasificación de las ficotoxinas se realiza en cinco grandes grupos en función del tipo de intoxicación que producen: toxinas paralizantes (PSP), toxinas diarreicas (DSP), toxinas neurotóxicas (NSP), toxinas ciguatera (CFP) y toxinas amnésicas (ASP) (Van Dolah, F.M., 2000, *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection.*, 19-44). Hay otros grupos de ficotoxinas que producen síntomas distintos y que no se incluyen en los grupos anteriores, son: las pectenotoxinas (PTXs), azaspirácidos y yessotoxinas (YTXs) (Van Dolah, F.M., 2000, *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection.*, 19-44). Inicialmente PTXs y YTXs se agruparon con las DSP puesto que se trata de toxinas lipofílicas que suelen coexistir en los episodios tóxicos. Sin embargo, en la última década, se han considerado un grupo aparte porque no inducen diarrea, su toxicidad oral es baja y sus moléculas son diferentes (Draisci, R., Lucentini, L. *et al.*, 2000, *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection.*, 289-324). Dentro de estos últimos grupos, las yessotoxinas (en adelante, YTXs) representan un grave problema económico por su reciente y ubicua presencia, y por la ausencia de un método sensible y específico para su detección.

Las YTXs han sido detectados en Japón, Europa, Nueva Zelanda y Chile, y son producidas por los dinoflagelados *Protoceratim reticulatum* y *Lingulodinium polyedrum* (*Gonyaulax polyedra*). Estas toxinas se acumulan en los moluscos marinos y son estables con el calor, por lo que no se destruyen durante la cocción de los productos marinos. Su absorción, desde el tubo digestivo, es baja y por eso no resultan tóxicas cuando se ingieren por vía oral, aunque se han detectado modificaciones histopatológicas en el hígado y en el páncreas de ratas tras una administración oral de YTXs (Terao, K., Ito, E. *et al.*, 1990, *Toxicon*, 28, 1095-1104). Sin embargo, tras una inyección intraperitoneal estas toxinas dan lugar a importantes efectos cardiotoxicos y muestran una elevada potencia letal (Draisci, R., Lucentini, L. *et al.*, 2000, *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection.*, 289-324). Estos efectos intraperitoneales deben de ser tenidos en cuenta porque, como se ha mencionado, las YTXs coexisten con la toxinas DSP, y en la detección de estas últimas por bioensayo pueden dar lugar a interferencias que lleven a la detección de falsos positivos. Por este motivo, en la preparación de extractos de productos pesqueros para monitorizar la presencia de estas toxinas, es necesario realizar extracciones adicionales con disolventes orgánicos que separan toxinas DSP y YTXs. Aunque, estas modificaciones suponen la extracción de gran cantidad de ácidos grasos que también pueden dar lugar a falsos

positivos (Yasumoto, T., Murata, M. *et al.*, 1984, ACS Symp. Series. No 262. *Seafood toxins.*, 207-214).

Los métodos de detección de ficotoxinas en muestras procedentes de extractos de productos marinos se clasifican en métodos de ensayo y métodos analíticos. Los métodos de ensayo son los que proporcionan un valor del contenido total de toxinas al medir una respuesta única, biológica o bioquímica, que engloba la actividad de todas las toxinas presentes en la muestra. Los métodos analíticos son aquellos en los que se realiza una separación, identificación y cuantificación individual de las toxinas de la muestra en función de una respuesta instrumental. En los primeros se incluyen ensayos *in vivo*, en ratas o ratones, y ensayos *in vitro*, entre los que destacan ensayos de inhibición enzimática, ensayos celulares, ensayos de receptor, etc. En estos casos, la determinación de toxicidad se realiza en función de una curva dosis-respuesta que se obtiene con una de las toxinas representativa de cada grupo. La cuantificación de la respuesta se realiza, entre otros, mediante métodos coorimétricos, fluorimétricos, de luminiscencia, de fluorescencia polarizada o de determinación de interacciones ligando-receptor en tiempo real con biosensores. Los segundos son ensayos *in vitro* que requieren una calibración previa del equipo instrumental con patrones de concentración conocida de cada toxina. Estos ensayos incluyen métodos químicos como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), espectrometría de masas o electroforesis capilar. Generalmente, los métodos químicos instrumentales se utilizan cuando es necesario identificar y cuantificar cada una de las toxinas presentes en una muestra. Sin embargo, en los programas de monitorización o de control sanitario se da una mayor relevancia al conocimiento de la toxicidad global potencial y por eso se utilizan métodos de ensayo, también llamados métodos funcionales (Fernández, M.L., Míguez, A. *et al.*, 2002, *Floraciones algales nocivas en el cono sur americano*).

Para la detección de YTXs en moluscos contaminados existen varios métodos analíticos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (Draisci, R., Pallechi, L. *et al.*, 1999, *J Chromatogr A*, 847, 213-221; Goto, H., Igarashi, T. *et al.*, 2001, *J Chromatogr A*, 907, 181-189) y de HPLC por fluorescencia (Ramstad, H., Larsen, S. *et al.*, 2001, *Toxicon*, 39, 1393-1397; Yasumoto, T. and Takizawa, A., 1997, *Biosci Biotechnol Biochem*, 61, 1775-1777). Dentro de los ensayos funcionales *in vitro* para detectar estas toxinas existen dos de reciente aparición: el ensayo de detección de E-cadherina (Pierotti, S., Malaguti, C. *et al.*, 2003, *Anal Biochem*, 312, 208-216; Rossini, G.P., 2002, *International Application published under the patent cooperation treaty.*) y el ensayo de activación de la caspasa (Malaguti, C., Ciminello, P. *et al.*, 2002, *Toxicol in Vitro*, 16, 357-363). Sin embargo, el único método oficialmente aceptado es el bioensayo de ratón, según Decisión 2002/225/CEE del 15 de marzo de 2002. Esta Decisión establece que el nivel máximo de YTXs en una muestra de molusco es de 1 mg de YTXs por Kg de carne de molusco. El bioensayo consiste en la observación, durante 24 horas, de tres ratones a los que se ha inoculado por vía intraperitoneal un extracto equivalente a 5 gramos de glándula digestiva de molusco, donde se suelen acumular las YTXs, o a 25 gramos de molusco entero. Como la cantidad máxima permitida de YTX podría inducir la muerte por vía intraperitoneal en 6 horas, este ensayo

ha sido modificado acortando el tiempo de observación e introduciendo en el método extracciones adicionales (Yasumoto, T., Murata, M. *et al.*, 1984, ACS Symp. Series. No 262. Seafood toxins., 207-214). Estas extracciones permiten separar toxinas DSP, PTXs y azaspirácidos de YTXs, aunque suponen la extracción de gran cantidad de ácidos grasos. Si de los tres ratones inoculados se producen dos muertes se considera que hay YTX en el extracto. Esta técnica supone el sacrificio de animales, no da un valor exacto de concentración de toxina, es poco reproducible, da lugar a falsos positivos y se necesita un proceso de extracción adicional para poder discriminar la presencia de otras toxinas. Los otros métodos biológicos mencionados para detectar YTXs son métodos lentos con los que no se obtienen resultados en menos de 24-48 horas y requieren un cuidadoso proceso de extracción de las toxinas. Además, no se basan en una característica propia y única de las YTXs, ya que junto a estas toxinas se detectan otras DSP.

Se han realizado diversos estudios para determinar la diana celular y, por lo tanto, el mecanismo de acción de las YTXs. La YTX posee una molécula lipofílica compuesta por once anillos con grupos éter unidos a una cadena lateral insaturada y a dos ésteres sulfónicos.

En la Figura 1 se representan algunos de los análogos naturales de la YTX que se diferencian en los sustituyentes de la cadena lateral, aunque recientemente se han descrito más de 50 derivados naturales cuya estructura aún no ha sido identificada. En estudios *in vitro* con YTX se ha observado que puede producir apoptosis, aunque su potencia es menor que la del ácido okadaico, una toxina DSP que suele aparecer asociada a la YTX (Leira, F., Alvarez, C. *et al.*, 2001, Toxicology *in vitro*, 15, 277-283); y al contrario de lo que ocurre con el ácido okadaico, la YTX no inhibe a las fosfatasa celulares (Draisci, R., Lucentini, L. *et al.*, 2000, Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection., 289-324). También se ha descrito que la YTX modifica los niveles citosólicos de calcio en linfocitos (De la Rosa, L.A., Alfonso, A. *et al.*, 2001, Biochem. Pharmacol., 61, 827-833), y aumenta el flujo de calcio inducido por maitotoxina en estas mismas células (De la Rosa, L.A., Alfonso, A. *et al.*, 2001, Cell Signal, 13, 711-716). Recientemente, se ha observado que la YTX disminuye los niveles intracelulares del segundo mensajero adenosina monofosfato cíclico (AMPC) a través de la activación de las fosfodiesterasas celulares (PDEs) que son los enzimas que destruyen el AMPC, lo que apunta a que estos enzimas pueden ser una de las dianas celulares de las YTXs (Alfonso, A., de la Rosa, L.A. *et al.*, 2003, Biochem Pharmacol, 65, 193-208).

En las células de mamíferos existen unas 11 familias de PDE con diferentes isoformas (Houslay, M.D. and Adams, D.R., 2003, Biochem J., 370, 1-18). Estos enzimas regulan y mantienen constantes los niveles de AMPC y de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que son segundos mensajeros necesarios para el funcionamiento celular implicados en multitud de funciones vitales (Soderling, S.H. and Beavo, J.A., 2000, Curr. Opin. Cell. Biol., 12).

Aprovechando la reciente descripción del mecanismo de acción de las YTXs, la presente invención desarrolla métodos para la detección de estas toxinas, en extractos procedentes de productos pesqueros, basados en su afinidad específica por las PDEs celulares.

Se trata de ensayos funcionales en los que no interfiere la presencia de otras toxinas cuyo mecanismo de acción es distinto, es decir que no actúan sobre las PDEs, pero que coexisten en episodios tóxicos con la YTX. Además, se evitan falsos positivos, el sacrificio de animales, y se agiliza el proceso de monitorización de contaminación en dichos productos, puesto que se pueden obtener resultados sobre concentración exacta de toxina en 1-2 horas.

La invención propuesta describe dos utilidades basadas en el descubrimiento de que la YTX es un activador de la PDEs y trata sobre la conversión de esta activación en una señal medible.

Utilidad 1

Método de determinación de las uniones biomoleculares PDEs-YTX empleando un sensor de afinidad

La determinación de interacciones moleculares en tiempo real por medio de un biosensor es una técnica nueva cuya aplicación se está extendiendo a diferentes campos de investigación (Hide, M., Tsutsui, T. *et al.*, 2002, Anal Biochem, 302, 28-37; Lee, T.H., Mozsolits, H. *et al.*, 2001, J Pept Res, 58, 464-476; Mariotti, E., Minunni, M. *et al.*, 2002, Anal Chim Acta, 453, 165-172; Tsoi, P.Y. and Yang, M.S., 2002, Biochem J, 361, 317-325). Se utiliza un biosensor que es un equipo que detecta reacciones moleculares entre una molécula biológicamente activa, llamada ligando, y otra molécula a la que se une, llamada ligante. El ligando va unido a la superficie de soporte del equipo, generalmente una cubeta o una placa. En la superficie de soporte, donde se producen las uniones, se genera un campo electromagnético, llamado campo evanescente, que es extremadamente sensible a los cambios de masa. El biosensor transforma los cambios de masa, que se producen en la superficie de soporte debidos a la unión ligando-ligante, en una señal eléctrica. Son modelos comerciales de biosensor, utilizables para este método, los que comercializan la casa Biacore o Thermo Labsystems. En la presente invención, las PDEs ejercen como ligando y a ellas se adicionan muestras con YTX que ejerce como ligante. La señal en el biosensor será mayor o menor en función de la cantidad de toxina unida a las PDEs y, por lo tanto, en función de la YTX presente en la muestra.

Las PDEs celulares, que ejercen como ligando, se unen a la superficie de soporte. Sobre esta superficie se añaden posteriormente concentraciones conocidas de YTX, que se comporta como ligante. La técnica funciona bien empleando superficie planas o formadas por una matriz. La unión PDEs-YTX sigue una cinética que se ajusta a una ecuación de pseudo-primer orden, de la cual se obtiene una constante que se denomina velocidad aparente de unión (Vap), y que es distinta para cada concentración de toxina. Con los datos de Vap y de concentración de toxina se realiza una recta de calibrado. Se añade sobre la superficie una muestra problema (extracto de productos pesqueros), se calcula su Vap y situando ese valor en la recta de calibrado se puede conocer la concentración de YTX en la muestra problema.

Modo de realización de la invención

El método se realiza a una temperatura entre 22 y 37°C.

a.- Sobre una superficie de doble compartimento activada se añade una solución de PDEs en una concentración entre 0.1-0.24 mg/mL a pH 7.7. Estos enzimas se unen a la superficie de soporte por enlaces covalentes no disociables. A continuación se bloquean

los grupos activos a los que no se unieron las PDEs con diferentes soluciones bloqueantes (BSA, Etanolamina, Tris-HCl...).

b.- En un compartimento se añade una solución con YTX en una concentración conocida. El otro compartimento se utiliza como blanco y en él se añade el disolvente de la toxina. Se registra la cinética de asociación entre las PDEs y la YTX durante 15 minutos.

c.- Se procede a la disociación ligando-ligante lavando los dos compartimentos con solución tampón a pH 7.7, de esta forma se disocian la YTX de las PDEs.

d.- Se regenera los compartimentos con una solución ácida o básica para eliminar completamente la YTX. De esta forma las PDEs quedan accesibles para una nueva adición de YTX.

e.- Se repiten los pasos b, c y d con 5 concentraciones distintas de YTX.

f.- A partir de las cinéticas de asociación para cada concentración de toxina se obtienen las velocidades aparentes de unión (Vap). La representación de los valores de Vap frente a las concentraciones de YTX sigue un ajuste lineal con un coeficiente de regresión mayor de 0,9. De esta forma se obtiene una recta con la que se puede determinar la concentración de YTX de una muestra si se conoce su Vap.

g.- Se realiza una extracción de la carne del producto pesquero a estudiar. Esta extracción se realiza siguiendo la Decisión 2002/225/CEE del 15 de marzo de 2002 o cualquier otro método oficial (D.O.G.A., 1986, Decreto 328/1986 del 30 de Octubre. Diario oficial de Galicia, 224) para la determinación de niveles máximos y método de análisis de ciertas toxinas marinas presentes en distintos productos pesqueros. Se toma una alícuota del extracto (muestra problema) y se añade sobre la PDE ligada a la superficie. Se obtiene una cinética de asociación a partir de la cual se calcula su Vap. Situando ese valor, Vap problema, en la recta de regresión obtenida se puede saber la concentración de YTX presente en la muestra.

En la Figura 2 se muestra el perfil gráfico con los pasos a seguir en este método, desde la activación de la superficie hasta la adición de la muestra problema. En la Figura 3 se muestra la recta de regresión con los valores de Vap frente a concentraciones conocidas de YTX.

Utilidad 2

Método de determinación de la activación de las PDEs por la YTX empleando una molécula fluorescente

Una forma habitual de detectar la actividad de las PDEs celulares es observar su capacidad para destruir al AMPc. Existe un derivado fluorescente del AMPc, el antraniloil-AMPc (longitud de onda de excitación: 350 nm, longitud de onda de emisión: 445 nm), cuya fluorescencia disminuye a medida que es degradado. La disminución de la fluorescencia en el tiempo se puede expresar como velocidad de destrucción del AMPc. En presencia de PDEs la velocidad de destrucción aumenta y, si estos enzimas están activados, la velocidad de degradación será aún mayor. En la presente invención se determina la velocidad de degradación del indicador fluorescente antraniloil-AMPc en presencia de PDEs y se estudia su variación cuando se adicionan muestras con YTX. La fluorescencia se lee en un fluorímetro preparado para leer placas de microtitulación. Se determina la velocidad de destrucción en presencia de varias concentraciones conocidas

de YTX. La representación de velocidad de destrucción frente a la concentración de toxina sigue un ajuste lineal con un coeficiente de regresión mayor de 0,9. De esta forma se obtiene una recta de regresión en la que se puede transformar en concentración de YTX el valor de velocidad de destrucción obtenido con una muestra procedente de productos pesqueros (muestra problema).

Modo de realización de la invención

El método se realiza en una placa de microtitulación en un rango de temperatura entre 22 y 37°C y la fluorescencia se mide a 360 nanómetros de longitud de onda de excitación y 460 nanómetros de longitud de onda de emisión.

Existen cuatro tipos de pocillos y cada uno se realiza por duplicado.

Pocillos A: Pocillos para cálculo de concentración de AMPc. En ellos se adiciona antraniloil-AMPc (indicador fluorescente) en 5 concentraciones entre 2 y 10 μ M.

Pocillos B: Pocillos control con 8 μ M de indicador fluorescente y enzimas.

Pocillos C: Pocillos de calibración con 8 μ M de indicador fluorescente, enzimas y concentraciones conocidas de YTX.

Pocillos D: Pocillos muestra problema con 8 μ M de indicador fluorescente, enzimas y muestra procedente de un extracto de cualquier producto pesquero.

a.- Se adiciona en todos los pocillos tampón de ensayo (10 mM Tris Hcl + 1 mM CaCl₂ pH 7.4) para un volumen final de incubación de 100 μ L, y la cantidad correspondiente, dependiendo del tipo de pocillo, de antraniloil-AMPc.

b.- En los pocillos B, C y D se adicionan entre 2 y 5 μ g de PDEs y se realiza una nueva lectura durante 2 minutos.

c.- En los pocillos C y D se adiciona YTX en concentración conocida o una muestra procedente de un extracto pesquero. La YTX se adiciona en concentraciones entre 0,1 y 10 μ M. Las muestras procedentes de un extracto se obtienen siguiendo la Decisión 2002/225/CEE del 15 de marzo de 2002 o cualquier otro método oficial (D.O.G.A., 1986, Decreto 328/1986 del 30 de Octubre. Diario oficial de Galicia, 224) para la determinación de niveles máximos y método de análisis de ciertas toxinas marinas presentes en distintos productos pesqueros.

d.- Tras estas adiciones se agita la placa y se realizan sucesivas medidas de la fluorescencia durante 15 minutos, adquiriendo datos cada minuto.

e.- Representando los datos de fluorescencia obtenidos con los pocillos A frente a la concentración de indicador de cada pocillo se obtiene una recta con un coeficiente de regresión superior a 0.999.

f.- Con la recta anterior se transforman los datos de fluorescencia del resto de los pocillos en concentración de antraniloil-AMPc. A partir de la concentración de AMPc a tiempo cero de adición de toxina y de la concentración después de 10 minutos se obtiene la cantidad de indicador destruido por unidad de tiempo, es decir, la velocidad de destrucción del AMPc.

g.- Los datos de velocidad de destrucción obtenidos con los pocillos B se consideran velocidad de destrucción control.

h.- Representado los datos de velocidad de destrucción de los pocillos C frente a la concentración de YTX se obtiene una recta patrón de concentración de YTX. Sustituyendo en esta recta la velocidad de

destrucción obtenida en los pocillo D se determina la concentración de YTX en esa muestra.

En la Figura 4 se representa la recta de calibrado de unidades de fluorescencia frente a concentración de antraniloil AMPc. En la Figura 5 se representa la recta patrón de velocidades de destrucción del AMPc frente a la concentración de YTX de un ensayo tipo.

Bibliografía

Alfonso, A., de la Rosa, L. A., Vieytes, M. R., Yasumoto, T. and Botana, L. M. (2003). "Yessotoxin a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes." *Biochem Pharmacol* **65**: 193-208.

D.O.G.A. (1986). Decreto 328/1986 del 30 de Octubre. Diario oficial de Galicia **224**.

De la Rosa, L. A., Alfonso, A., Vilariño, N., Vieytes, M. R. and Botana, L. M. (2001). "Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxina novel marine phycotoxin." *Biochem. Pharmacol.* **61**(7): 827-833.

De la Rosa, L. A., Alfonso, A., Vilariño, N., Vieytes, M. R., Yasumoto, T. and Botana, L. M. (2001). "Maitotoxin-induced calcium entry in human lymphocytes - Modulation by yessotoxin, Ca²⁺ channel blockers and kinases." *Cell Signal* **13**(10): 711-716.

Draisci, R., Lucentini, L. and Mascioni, A. (2000). Enteric toxic episodes. Pectenotoxins and yessotoxins: chemistry, toxicology, pharmacology and analysis. *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*. Botana, L. M. New York, Marcel Dekker: 289-324.

Draisci, R., Paleschi, L., Giannetti, L., Lucentini, L., James, K. J., Bishop, A. G., Satake, M. and Yasumoto, T. (1999). "New approach to the direct detection of known and new diarrhoeic shellfish toxins in mussels and phytoplankton by liquid chromatography-mass spectrometry." *J Chromatogr A* **847**(1-2): 213-221.

Fernández, M. L., Míguez, A., Cacho, E., Martínez, A., Diogéne, J. and Yasumoto, T. (2002). Bioensayos con mamíferos y ensayos bioquímicos y celulares para la detección de ficotoxinas. *Floraciones algales nocivas en el cono sur americano*. Sar, E. A., Ferrario, M. E. and Reguera, M. Madrid, UNESCO y Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Goto, H., Igarashi, T., Yamamoto, M., Yasuda, M., Sekiguchi, R., Watai, M., Tanno, K. and Yasumoto, T. (2001). "Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry." *J Chromatogr A* **907**(1-2): 181-189.

Hide, M., Tsutsui, T., Sato, H., Nishimura, T., Morimoto, K., Yamamoto, S. and Yoshizato, K. (2002). "Real-time analysis of ligand-induced cell surface and intracellular reactions of living mast cells using a surface plasmon resonance-based biosensor." *Anal Biochem* **302**(1): 28-37.

Houslay, M. D. and Adams, D. R. (2003). "PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and

compartmentalization." *Biochem J* **370**: 1-18.

Lee, T. H., Mozsolits, H. and Aguilar, M. I. (2001). "Measurement of the affinity of melittin for zwitterionic and anionic membranes using immobilized lipid biosensors." *J Pept Res* **58**(6): 464-476.

Leira, F., Alvarez, C., Vieites, J. M., Vieytes, M. R. and Botana, L. M. (2001). "Okadaic acid and yessotoxin induce caspase-3 mediated apoptosis in neuroblastoma cells. Characterization of distinct apoptotic changes induced by these phycotoxins in the BE (2)-M17 cell line by means of new fluorimetric microplate assays." *Toxicology in vitro* **15**: 277-283.

Malaguti, C., Ciminello, P., Fattorusso, E. and Rossini, G. P. (2002). "Caspase activation and death induced by yessotoxin in HeLa cells." *Toxicol in Vitro* **16**(4): 357-363.

Mariotti, E., Minunni, M. and Mascini, M. (2002). "Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection." *Anal Chim Acta* **453**(2): 165-172.

Pierotti, S., Malaguti, C., Milandri, A., Poletti, R. and Rossini, P. (2003). "Functional assay to measure yessotoxins in contaminated mussel samples." *Anal Biochem* **312**(2): 208-216.

Ramstad, H., Larsen, S. and Aune, T. (2001). "Repeatability and validity of a fluorimetric HPLC method in the quantification of yessotoxin in blue mussels (*Mytilus edulis*) related to the mouse bioassay." *Toxicol* **39**(9): 1393-1397.

Rossini, G. P. (2002). Process for measurement of dinophysistoxin and of yessotoxin. WO 02/03060 A2. *International Application published under the patent cooperation treaty*. Soderling, S. H. and Beavo, J. A. (2000). "Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions." *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**(174-179).

Terao, K., Ito, E., Oarada, M., Murata, M. and Yasumoto, T. (1990). "Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning-5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative." *Toxicol* **28**: 1095-1104.

Tsoi, P. Y. and Yang, M. S. (2002). "Kinetic study of various binding modes between human DNA polymerase beta and different DNA substrates by surface-plasmon-resonance biosensor." *Biochem J* **361**(2): 317-325.

Van Dolah, F. M. (2000). Diversity of marine and freshwater algal toxins. *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*. Botana, L. M. New York, Marcel Dekker: 19-44.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsu-moto, G. K. and Glardy, J. (1984). Diarrhetic shellfish poisoning. *ACS Symp. Series. No 262. Seafood toxins*. Ragelis, E. P. Washington, D.C., American Chemical Society: 207-214.

Yasumoto, T. and Takizawa, A. (1997). "Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography." *Biosci Biotechnol Biochem* **61**(10): 1775-1777.

REIVINDICACIONES

1. Método cuantitativo para la detección de yessotoxinas (YTXs) en productos pesqueros basado en la activación que las toxinas producen en las fosfodiesterasas celulares.

2. Método para la detección de YTXs en productos pesqueros, según la reivindicación 1, basado en la activación de las YTXs sobre las PDEs, **caracterizado** por la utilización de biosensores de afinidad que emplean como ligando las PDEs que se unen a una superficie de soporte, plana o de matriz, capaz de generar interacciones moleculares cuantificables mediante el efecto de evanescencia, en un rango de temperaturas de 20-37°C, sobre la que se añaden YTXs, que se comportan como ligante, ajustándose este ligamiento a una cinética de pseudo-primer orden de la cual se obtiene una velocidad aparente de unión (Vap) YTX-PDEs.

3. Método para la detección de YTXs en productos pesqueros, según la reivindicación 2, **caracterizado** por la determinación de las velocidades aparentes de unión para concentraciones conocidas de YTXs y la elaboración de una recta de calibrado con la que se calcula la concentración de YTX en una muestra problema de un extracto de producto pesquero de la cual

se conoce su velocidad aparente de unión.

4. Método para la detección de YTXs en productos pesqueros, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la detección mediante fluorescencia de la actividad PDE empleando un sustrato fluorescente análogo del AMPc y calculando la concentración de YTXs de una muestra procedente de productos pesqueros a partir de una recta de calibrado elaborada con las velocidades de destrucción del sustrato fluorescente obtenidas para concentraciones conocidas de YTX.

5. Método para la detección de YTXs en productos pesqueros, según la reivindicación 4, **caracterizado** por la detección mediante fluorescencia de la actividad PDE empleando como sustrato el antraniloil-AMPc.

6. Método para la detección de YTXs en productos pesqueros, según la reivindicación 4, **caracterizado** por la determinación del cambio de la intensidad de fluorescencia polarizada, y como consecuencia de las unidades de polarización, que tiene lugar al unirse la YTX a las PDEs.

7. Utilización del método para la detección de YTXs en productos pesqueros, según las reivindicaciones 2, 3 ó 6, para detectar actividades equivalentes a la YTX (activación de PDEs) en compuestos químicos de origen natural o de síntesis.

30

35

40

45

50

55

60

65

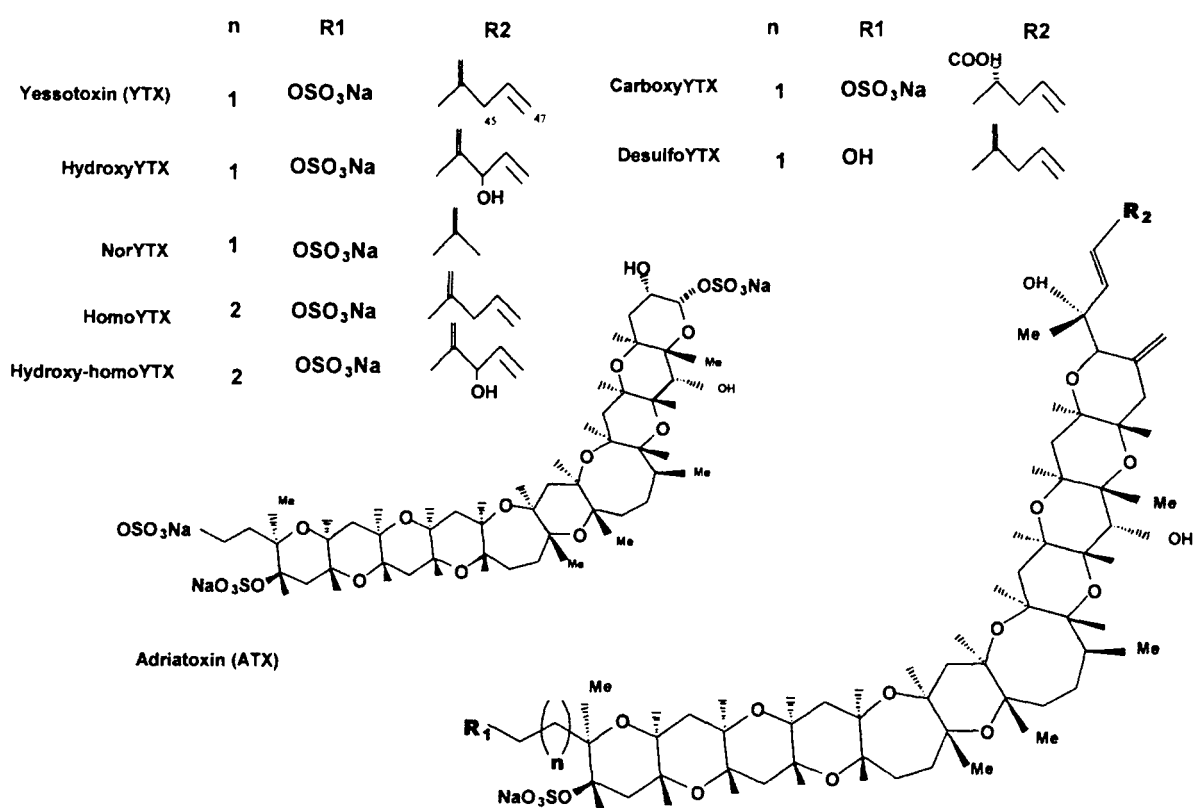


FIGURA 1

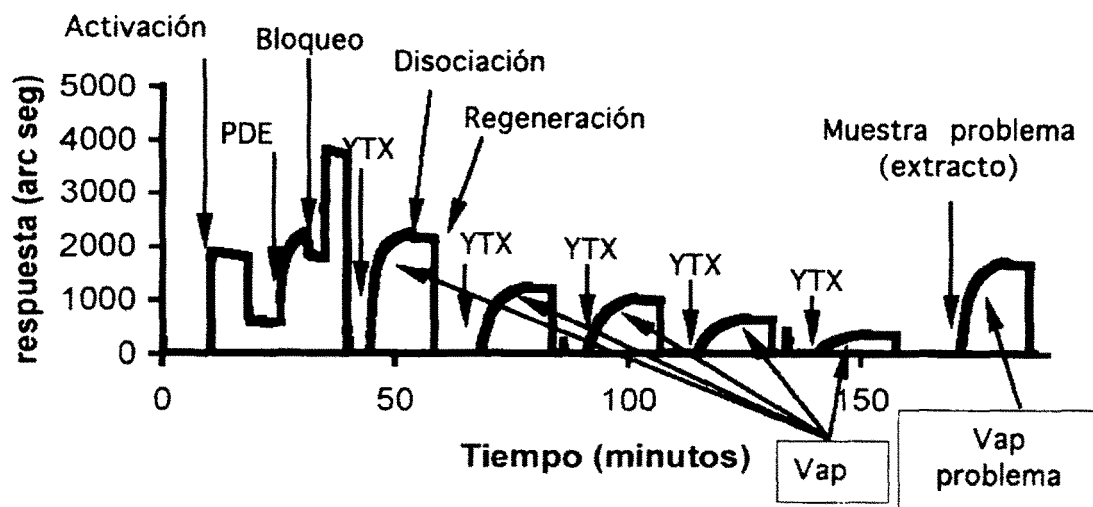


FIGURA 2

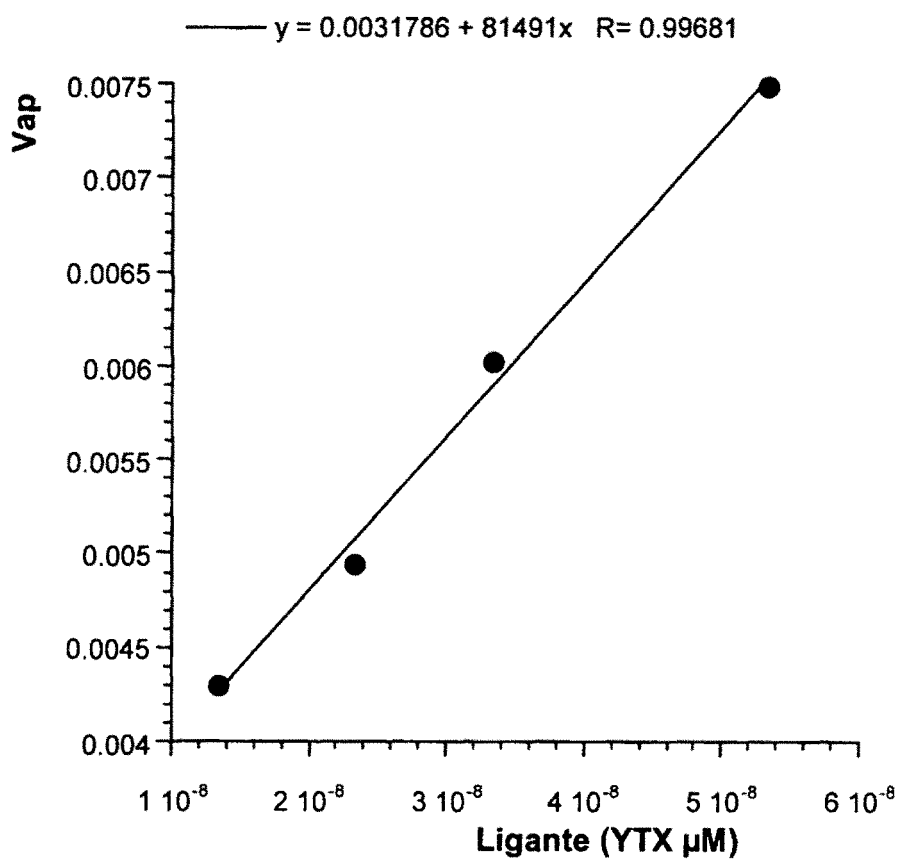


FIGURA 3

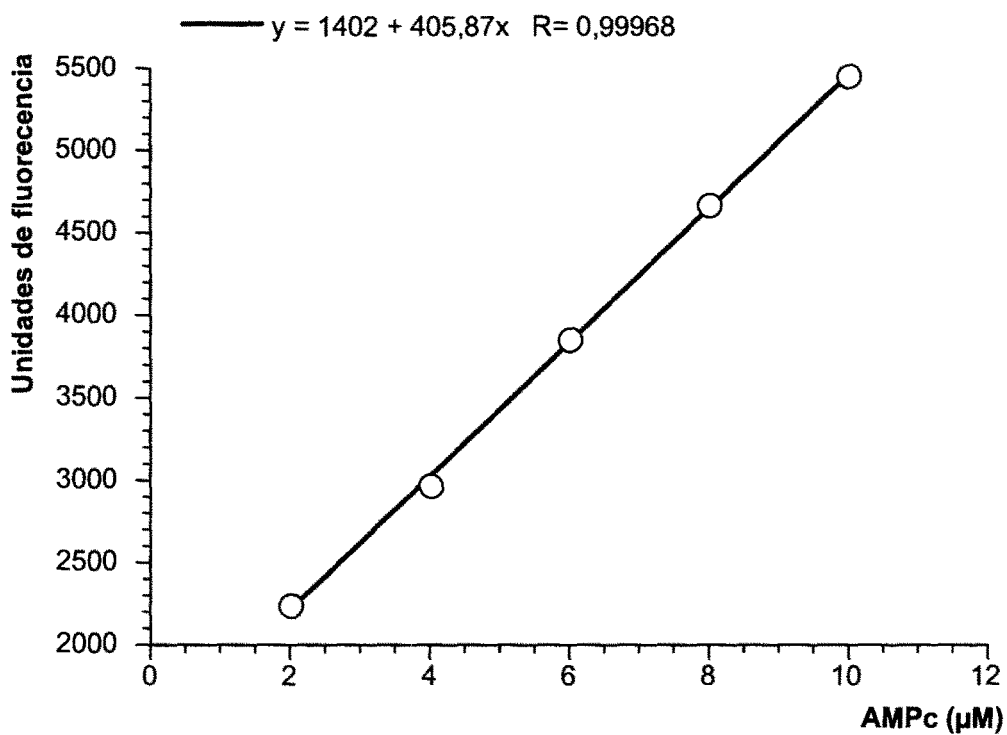


FIGURA 4

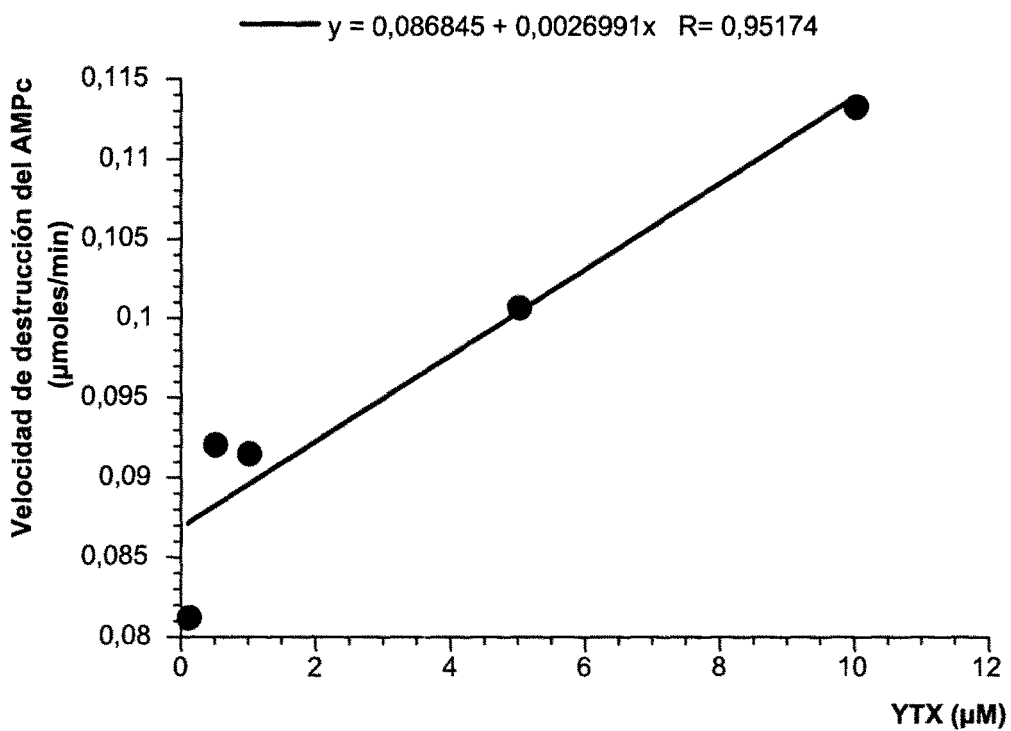


FIGURA 5



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 235 611

② Nº de solicitud: 200301773

③ Fecha de presentación de la solicitud: 25.07.2003

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12Q 1/44, G01N 21/64

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ALFONSO, A. et al.: "Determination of phosphodiesterase activity in rat mast cells using the fluorescent cAMP analogue anthraniloyl cAMP", Cellular Signalling, (1995), Vol. 7, nº 5, páginas 513-518, todo el documento.	3-5
A	RAMSTAD, H. et al.: Repeatability and validity of a fluorimetric HPLC method in the quantification of yessotoxin in blue mussels (Mytilus edulis) related to the mouse bioassay", Toxicon, (2001), Vol. 39, páginas 1393-1397, todo el documento.	1-7
A	ALFONSO, A. et al.: "Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes", Biochem. Pharmacol., (15.01.2003), Vol. 65, páginas 193-208, todo el documento.	1-7
A	US 20030138856 A1 (ROSSINI, G.P.) 24.07.2003, todo el documento.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

01.06.2005

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1